

Biologische Produktion von Milchsäureethylester

Eine Studienarbeit am Institut Verfahrenstechnik der TU Berlin

von Thomas Khakpour

Einleitung

Das Interesse an „Weißen Technologien“¹ wächst in Zeiten, in denen die Angst vor Umweltverschmutzung und Engpässe fossiler Ressourcen, Einfluss auf Politik, Wirtschaft und Privatleben nimmt. Die „Weißen Technologien“ haben klare Vorteile im Vergleich zu den chemischen, konventionellen Prozessen, da sie nachwachsende Rohstoffe als Ausgangsmaterial nutzen, weniger Produktionsschritte bei hoher Selektivität benötigen und durch ihre milden Prozesstemperaturen weniger Energie- und Entsorgungskosten bedeuten [2]. Das hat verminderte Schadstoffemissionen zur Folge und ermöglicht einen verantwortungsvolleren Umgang mit der Umwelt.

Das Projekt, in dessen Rahmen diese Arbeit am Institut Verfahrenstechnik der TU Berlin entstand, beschäftigt sich mit einem Teilgebiet der „Weißen Technologie“, der Bildung von Milchsäureethylester zur Aufreinigung fermentativ hergestellter Milchsäure. Zurzeit wird diese kosten- und energieintensiv von der Fermentationsbrühe getrennt. Dies kann in einem separaten Prozessschritt durch eine chemische Reaktion passieren: Die Milchsäure wird bei hohem Ethanolüberschuss aufgeköcht, so dass Milchsäureethylester gebildet wird. Dieser Ester kann anschließend in mehrstufiger Destillation oder pervaporativ entfernt und in Milchsäure rehydrolisiert werden.

An diesem Punkt setzt das Projekt an: Es wird versucht, durch Kofermentation von Milchsäurebakterien und Hefen, Milchsäureethylester direkt zu produzieren. Der aufwendige und kostenintensive Abschnitt der separaten, chemischen Veresterung wird damit umgangen und in einen bereits vorhandenen Prozessabschnitt integriert.

Im Rahmen dieses Projekts wurde untersucht, ob die enzymatischen Tests der Firma diaglobal® eine Ergänzung oder sogar Alternative zur bestehenden Analytik sein könnten. Es wurden folgende Tests untersucht:

- Glucosetest GLU142
- Lactattest LAC142
- Alkoholtest ALK121

Zur Kontrolle der Reproduzierbarkeit und des Einflusses inhibierender Stoffe der Nährmedien oder Stoffwechselnebenprodukte der Mikroorganismen, die eine Fehlmessung bei den enzymatischen Tests verursachen könnten, wurden Kalibrierungsreihen aufgenommen. Desweiteren wurden die Messergebnisse mit chromatographisch ermittelten Werten renommierter und zertifizierter Labore verglichen. Als Vorlage dienten synthetische Nährmedien, die auch in den Fermentationsversuchen zum Einsatz kamen. Diese wurden mit Milchsäurebakterien oder Hefen angeimpft.

¹Die Weiße Biotechnologie nutzt Organismen und deren Bestandteile für die industrielle Produktion [1].

Die chromatographisch gemessene Glucosekonzentration der Probelösung wurde als **GLU142** Ausgangskonzentration der Verdünnungsreihe genommen.

Die Kalibrierungskurve des GLU142 zeigte eine gute Linearität im Messbereich zwischen 0,3 und 6 g/L, so dass davon ausgegangen werden kann, dass eventuell inhibierende Matrixeffekte² keinen großen Einfluss auf die Messergebnisse haben.

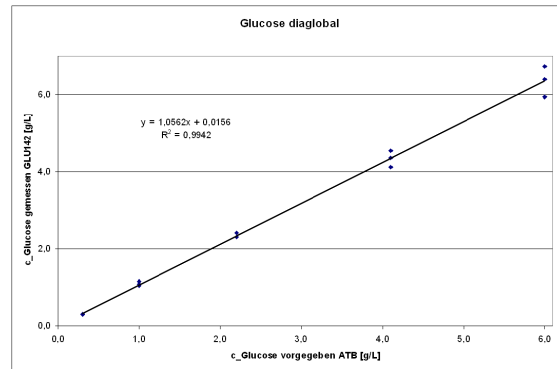


Abbildung 1: Kalibrierungskurve GLU142 diaglobal[®]

Der Vergleich der Einzelmessungen des GLU142 mit den chromatographisch ermittelten Werten zeigten Abweichungen zwischen -2,3% und +15%. Die Abweichungen der Dreifachbestimmung lagen zwischen +2,9% und +9,7%. Der Mittelwert der Abweichungen der Einzel- und Dreifachbestimmung betrug +6,2%. In diesen Abweichungen ist der unbekannte Verdünnungs- und Pipettierfehler enthalten.

Die Abweichungen der Dreifachbestimmung und der Mittelwert der Abweichungen liegen mit unter 10% in einem guten Bereich.

Im Vergleich zu der bestehenden Analytik ist der GLU142 kostengünstig, einfacher zu bedienen und liefert schnelle und gute Messergebnisse. Der GLU142 könnte somit die bestehende Analytik des Projektes erweitern, beziehungsweise den schon bestehenden, preisintensiveren enzymatischen Test ablösen.

²Matrixeffekte sind die Summe der Störeffekte aller Komponenten, die in einer Probe vorkommen, und die Messung des Zielanalyten beeinflussen [3].

Die Ausgangskonzentration der Verdünnungsreihe wurde durch den LAC142 selbst gemessen.

LAC142

Auch beim LAC142 wurde eine gute Linearität der Kalibrierungskurve gefunden. Im Messbereich zwischen 0,2 g/L und 2,4 g/L kann daher davon ausgegangen werden, dass inhibierende Matrixeffekte keinen großen Einfluss auf die Messergebnisse haben. Dabei ist eine gute Reproduzierbarkeit der Einzelmessungen mit einer gemessenen Abweichung zwischen -4,0 % bis +9,7 % gegeben, sowie bei der Dreifachbestimmung mit -3,0 % bis +6,5 %. In diesen Abweichungen ist der unbekannte Verdünnungs- und Pipettierfehler enthalten.

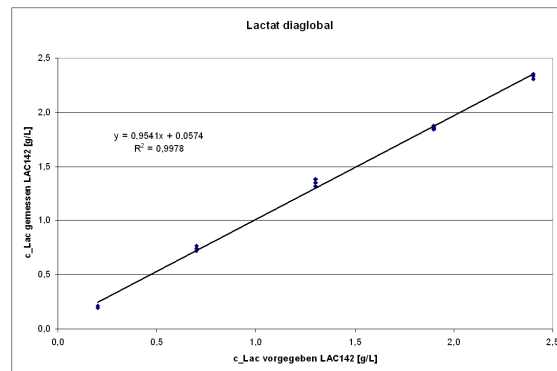


Abbildung 2: Kalibrierungskurve Lactattest LAC142 diaglobal®

Um die Ergebnisse aus der LAC142-Messung mit der chromatographisch ermittelten Milchsäurekonzentration zu vergleichen, musste für letztere der L-(+)-Lactatanteil ermittelt werden, da die chromatographische Methode nur den Gesamtlactat erfasst. Der L-(+)-Lactatanteil wurde dabei mit einem schon vorhandenen enzymatischen Lactattest bestimmt. Er ergab im Mittelwert einer Doppelbestimmung 83,4 % L-(+)-Lactatanteil. Die Messung der Standardlösung von 4 mmol/L L-(+)-Lactat betrug 4,3 mmol/L. Damit ergab sich für den L-(+)-Lactatanteil des chromatographisch ermittelten Wert:

$$c_{LAC142,gem} * \frac{c_{Standard}}{c_{LAC142,Standard}} * \frac{L}{L/D} = c_{LAC142,ber}$$

$$7,9 \text{ g/L} * \frac{4 \text{ mmol/L}}{4,3 \text{ mmol/L}} * 0,834 = 6,1 \text{ g/L}$$

Der Vergleich der Werte des LAC142 und diesen Wert wurde eine Abweichung bei den Einzelmessungen zwischen +13,5 % und +29,7 % und bei den Dreifachbestimmungen zwischen +14,7 % und +26 % gefunden. Dabei liegt die mittlere Abweichung der Einzelmessungen bei +20,7 %.

Die Abweichungen von dem chromatographisch ermittelten Wert sind zu groß, um eine quantitative Aussage mit dem LAC142 machen zu können.

Verwendet man statt dem mittleren L-(+)-Lactatanteil (83,4 %), den oberen der beiden Messwerte (89 %), ergibt sich dagegen eine mittlere Abweichung von +12,6 %. Diese

Abweichung ist ein recht befriedigendes Ergebnis. Es ist also fraglich, ob die oben beschriebene Methode der Kopplung des chromatographischen Messwertes mit einem weiteren enzymatischen Lactatatest, wirklich korrekte Werte liefert. Eine erneute Messung des L-(+)-Lactatanteils konnte aufgrund aufgebrauchten Probematerials nicht mehr vorgenommen werden.

Eine schnelle und grobe Abschätzung der L-(+)-Lactatkonzentration kann mit dem LAC142 aber trotzdem gemacht werden. Auch die kostengünstige und einfach zu bedienende Handhabung des LAC142 machen ihn zu einer Bereicherung der bestehenden Analytik.

Die Ausgangskonzentration der Verdünnungsreihe wurde durch den ALK121 selbst gemessen.

ALK121

Beim ALK121 wurde wiederum eine relativ gute Linearität der Kalibrierungskurve gemessen. Somit kann im gemessenen Bereich zwischen 0,1 g/L und 2,0 g/L davon ausgegangen werden, dass eventuell inhibierende Matrixeffekte keinen großen Einfluss auf die Messergebnisse haben werden. Es wurden Abweichungen bei den Einzelmessungen zwischen -20,0 % bis +7,0 % und bei der Dreifachbestimmung zwischen -13,9 % bis -1,3 % gemessen. In diesen Abweichungen ist der unbekannte Verdünnungs- und Pipettierfehler enthalten.

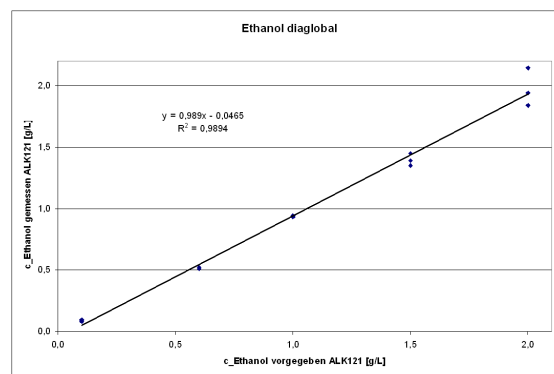


Abbildung 3: Kalibrierungskurve Alkoholttest ALK121 diaglobal®

Der ALK121 wurde durch Vergleich zwischen der Messung bei den einzelnen Verdünnungsstufen und dem chromatographischen Wert validiert. Es wurde chromatographisch eine Ethanolkonzentration von 11,1 g/L gemessen. Die Messung der Standardlösung von 1 g/L betrug 0,9 g/L. Somit ergab sich für den chromatographisch ermittelten Wert:

$$c_{ALK121,gem} * \frac{c_{Standard}}{c_{ALK121,Standard}} = c_{ALK121,ber}$$

$$11,1 \text{ g/L} * \frac{1 \text{ g/L}}{0,9 \text{ g/L}} = 12,2 \text{ g/L}$$

Bei dem Vergleich der Messwerte des ALK121 mit diesem Wert wurden Abweichungen bei den Einzelmessungen zwischen -7,0 % und +24,3 % und bei den Dreifachbestimmungen zwischen +0,1 % und +14,7 % ermittelt. Dabei liegt die mittlere Abweichung mit 7,3% in einem guten Bereich.

Obwohl Abweichungen über 14 % erreicht wurden, ist der ALK121 als schnelle Abschätzungen eine gute Ergänzung zu der bestehenden Analytik. Ebenso wie der LAC142, ist der ALK121 eine günstigere und einfachere Möglichkeit, als die chromatographische Messung.

Die drei enzymatischen Tests der Firma diaglobal[®] sind, nach unseren Messungen und dem Vergleich mit den chromatographisch ermittelten Werten, eine Bereicherung unserer Analytik. Sie zeichnen sich durch eine einfache Handhabung, kurzen Durchführungsdauer und dem eindeutigen Kostenvorteil gegenüber der bereits bestehenden Analytik aus. Die drei enzymatischen Tests lieferten gute Werte, um den Zustand des Fermentationsprozesses abschätzen zu können.

An dieser Stelle möchte ich mich bei der Firma diaglobal[®] und ihren Mitarbeitern für die Bereitstellung des Gerätes und ihre Hilfe bedanken, die mir bei der Erstellung meiner Studienarbeit sehr geholfen hat.

Dieses Projekt wurde am Institut Verfahrenstechnik der Technischen Universität Berlin von Dipl.-Ing. Cornelia Merz und Prof. Dr.-Ing. Matthias Kraume betreut.

Berlin, Oktober 2008

- [1] http://de.wikipedia.org/wiki/Weiße_Biotechnologie
- [2] Ebner, L.; Tomaschewski, G.; Illinger, J.
„Produkte, Verfahren und Technologien in Berlin Brandenburg“
Protektum - Umweltinstitut GmbH, Oranienburg (2008)
- [3] <http://www.candor-bioscience.de/de/produkte/glossar/matrixeffekte.php>